

0 719599-1

КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

ЗЯВКИНА ЮЛИЯ ИГОРЕВНА

**ИММОБИЛИЗОВАННАЯ ДНК КАК РЕАГЕНТ
ДЛЯ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЗКО-
И ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЭФФЕКТОРОВ**

02.00.02 - Аналитическая химия

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2000

Работа выполнена на химическом факультете Казанского государственного университета

Научные руководители: доктор химических наук,
профессор Н.А. УЛАХОВИЧ
кандидат химических наук,
доцент С.С. БАБКИНА

Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор М.И. ЕВГЕНЬЕВ
кандидат химических наук,
с.н.с. В.М. ГОРОХОВСКИЙ

Ведущая организация: Институт общей и неорганической химии
им. Н.С. Курнакова РАН, г. Москва

Защита состоится "22" декабря 2000 г. в 14 часов на заседании диссертационного Совета К 053.29.02 по химическим наукам Казанского государственного университета, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, химический факультет, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу:
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, КГУ, научная часть.

Автореферат разослан "21" ноября 2000 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета
кандидат химических наук

 Н.Р. Федотова

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
КФУ



0000947930

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Определение нуклеиновых кислот и их эффекторов – актуальная проблема современной аналитической химии. Один из перспективных путей решения этой проблемы – объединение возможностей чувствительных методов детекции и использование высокой специфичности биологических процессов, достижений биохимии и химии координационных соединений.

Использование биосенсоров (БС) на основе иммобилизованной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) позволяет расширить возможности электрохимических методов анализа эффекторов ДНК как в экологических объектах, поскольку молекулы ДНК очень чувствительны к присутствию различных загрязнителей окружающей среды, вызывающих повреждение структуры молекул, так и для анализа различных биосред организма, подвергнувшегося воздействию токсикантов. В результате может быть получена информация не только о содержании токсикантов, но и об их генетической токсичности и потенциальной опасности для последующих поколений.

БС на основе ДНК могут быть также использованы для высокочувствительного определения онкопрепаратов в сложных многокомпонентных системах как на стадии их синтеза и изучения фармакокинетики, так и в процессе лечения онкобольных.

Изучение взаимодействия ДНК с высокомолекулярными биологически активными веществами с помощью БС, в частности с антителами (Ат), специфичными к ДНК (аутоАт), позволяет моделировать участие ДНК в иммунологических реакциях и проводить диагностику различных аутоиммунных заболеваний.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований "Использование принципов иммунохимического анализа в вольтамперометрии" (номер проекта 97-03-33232а) и международным грантом INCO-Sorpticus (номер проекта ERBIC 15 СТ-98-0910).

Цель работы. Целью является разработка способа ковалентной иммобилизации денатурированной ДНК на нитроцеллюлозной мембране для создания амперометрического БС и его использование для изучения взаимодействия ДНК с биологически активными соединениями - эффекторами ДНК, такими как ионы тяжелых металлов, противоопухолевые препараты на основе комплексов Pt(II) и Pt(IV), аутоантитела с целью их определения в природных и биологических объектах.

Научная новизна и практическая значимость работы. Предложен новый способ ковалентной иммобилизации молекул ДНК, входящих в состав биочувствительной части амперометрического БС. ДНК иммобилизована в одонитовой денатурированной форме для создания новых возможностей взаимодействия эффекторов с ДНК и повышения чувствительности работы БС. Выявлены оптимальные условия функционирования БС (рН, температура, буферная емкость, ионная сила).

Исследована сорбционная способность свинца и кадмия по отношению к денатурированной ДНК (д-ДНК). Показана возможность определения низких содержаний ионов Pb(II) и Cd(II), в том числе при совместном присутствии, за счет их предварительного концентрирования на биочувствительной части сенсора.

Обнаружены каталитические волны выделения водорода в системах Pt(II)-ДНК и Pt(IV)-ДНК, которые использованы в качестве аналитического сигнала для определения содержания Pt(II) и Pt(IV).

На основе высокой специфичности иммунологической реакции ДНК-аутоАт стало возможным определение с помощью БС содержания высокомолекулярных эффекторов - аутоАт в широком диапазоне концентраций, что позволило проводить диагностику аутоиммунных заболеваний, характерной особенностью которых является повышенное содержание в сыворотке крови Ат к д-ДНК.

Найдены условия реактивации биочувствительной части сенсора на основе иммобилизованной д-ДНК (д-ИДНК) в зависимости от природы анализируемого объекта для многократного использования БС. Оценены значения констант связывания ДНК-аутоАт и ДНК-ион тяжелого металла с помощью предложенного БС.

На основе ДНК-содержащего амперометрического БС разработаны методики селективного, чувствительного и экспрессного определения ионов тяжелых металлов в биологических и экологических объектах, платиносодержащих фармпрепаратов в сыворотке крови человека, Ат алеутской болезни норки, специфичных к ДНК, в сыворотке крови животных.

На защиту выносятся:

—способ ковалентной иммобилизации д-ДНК на нитроцеллюлозной мембране путем подбора соотношения носитель - растворитель - биоконтакт для получения биочувствительной части амперометрического сенсора на основе стационарного ртутно-пленочного электрода с серебряной подложкой;

—оптимальные условия функционирования разработанного амперометрического БС (температура, pH и буферная емкость; условия реактивации биочувствительной части сенсора с целью многократного его использования;

—использование ДНК-содержащего БС для предварительного концентрирования микроколичеств ионов свинца и кадмия на биочувствительной части сенсора за счет комплексообразования ион тяжелого металла -ДНК и использование реакции комплексообразования Pb(II)-комплексон III и Cd(II)-комплексон III для определения низких содержаний ионов Pb(II) и Cd(II) в модельных растворах. Изотермы сорбции Ленгмюра ионов Pb(II) и Cd(II) на д-ДНК-содержащей биочувствительной части амперометрического сенсора;

—результаты исследования электрохимического поведения комплексов Pt(II) и Pt(IV) в присутствии БС на основе д-ИДНК; установление природы токов, полученных при комплексообразовании Pt(II)-ДНК и Pt(IV)-ДНК; результаты определения содержания Pt(II) и Pt(IV) при их совместном присутствии с использованием разработанного БС;

—возможность использования БС на основе д-ИДНК для контроля протекания иммунологической реакции ДНК-аутоАт и использования комплексообразования аутоАт-Pt(II) для расширения области определяемых содержаний аутоАт;

—результаты определения констант связывания ДНК- аутоАт и ДНК-тяжелый металл с помощью разработанного амперометрического БС;

—методики индивидуального определения и определения при совместном присутствии тяжелых металлов в биообъектах и объектах окружающей среды с помощью БС на основе д-ИДНК;

—методики определения противоопухолевых препаратов цисплатина и оксиплатина в сыворотке крови;

—методики определения содержания аутоАт к ДНК в сыворотке крови с помощью БС на основе д-ИДНК для диагностики аутоиммунных заболеваний на ранних стадиях.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на Международной школе по биоэлектрохимии им. Джулио Милаццо (г. Сегед, Венгрия, 1997г.), XVI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (г. Санкт-Петербург, 1998 г.), Поволжской региональной конференции "Физико-химические методы в координационной и аналитической химии" (Казань, 1999 г.), Всероссийской конференции по электрохимическим методам

анализа "ЭМА-99" (г. Москва, 1999 г.), Итоговой конференции Казанского государственного университета (Казань, 2000 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 работ. Из них 3 статьи в рецензируемых научных журналах.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 22 таблицы и 25 рисунков. Работа состоит из введения, 7 глав, выводов, списка литературы, включающего 181 ссылку.

В первой главе представлен обзор литературы, посвященный низко- и высокомолекулярным эффекторам ДНК, рассмотрены особенности их взаимодействия, предпочтительные центры координации в молекуле ДНК в зависимости от типа эффекторов, обсуждены последствия влияния тяжелых металлов на ДНК организма, описаны электрохимические методы анализа как нуклеиновых кислот, так и эффекторов ДНК, систематизирована информация о существующих на сегодняшний день электрохимических БС на основе нуклеиновых кислот, рассмотрены их аналитические возможности.

Во второй главе формулируется задача исследования, описываются объекты исследования, реагенты, аппаратура и условия проведения эксперимента.

В третьей главе рассмотрены особенности иммобилизации денатурированной ДНК для приготовления биочувствительной части сенсора и обосновывается выбор оптимальных условий функционирования БС.

Четвертая глава посвящена изучению электрохимического поведения ионов Cd(II) и Pb(II) в присутствии д-ИДНК содержащего БС, и возможности их определения с помощью данного БС и реакции комплексообразования тяжелый металл - Комплексон III, установлены параметры оптимизации определения ионов Cd(II) и Pb(II) . Показана возможность реактивации биочувствительной части сенсора для его многократного использования.

В пятой главе представлены результаты исследования электрохимического поведения комплексов ДНК- Pt(II) и ДНК- Pt(IV) , полученных в результате комплексообразования $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ и $\text{K}_2[\text{PtCl}_6]$ с д-ИДНК, изучена природа аналитического сигнала, обусловленного выделением каталитических токов водорода. Приводятся результаты определения содержания противоопухолевых препаратов цисплатина и оксиплатина в модельных растворах с помощью БС.

В шестой главе приведены результаты изучения биоспецифического взаимодействия д-ДНК с высокомолекулярными эффекторами- аутоАт, определение константы связывания ДНК-аутоАт и использование реакции комплексообразования ДНК- Pt(II) для определения аутоАт к ДНК с помощью БС на осно-

ве д-ИДНК, а также возможность использования комплексообразования аутоАт с $Pt(II)$ для расширения области определяемых содержаний ауто-Ат.

Седьмая глава посвящена различным аспектам аналитического применения амперометрического БС на основе д-ИДНК. Описываются методики анализа реальных биологических и экологических объектов с помощью ДНК-содержащего БС на содержание низко- и высокомолекулярных эффекторов ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вольтамперограммы регистрировали на приборах ППТ-I, ПУ-I (СССР) и СВА МБ-01 (Болгария). Циклические осцилловольтамперограммы регистрировали на осциллографическом полярографе ЦЛА ПО-5122, модель 03 (СССР) на кафедре аналитической химии КГУ. Рабочим электродом служил разработанный БС на основе стационарного ртутно-пленочного электрода с серебряной подложкой. Электрод сравнения - насыщенный каломельный электрод.

Объекты исследования: комплексные соединения $cis-[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ и $K_2[PtCl_6]$ (синтезированы профессором В.К. Половняком (кафедра неорганической химии КГТУ)), противоопухолевые фармпрепараты: цисплатин (cis -дихлородиаминплатина(II)) (любезно предоставлен ВЭО "Саламат" (г. Казань)), оксоплатин (cis -дихлордиамин-*транс*-дигидроксоплатина (IV)) (любезно предоставлен профессором Н.Н. Желиговской (кафедра аналитической химии МГУ)). Использовали $Cd(NO_3)_2$ и $Pb(NO_3)_2$ марки "хч". Использовали буферные растворы различной природы: (фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ), ацетатный буферный раствор, аммиачный буферный раствор, цитратный буферный раствор, боратный буферный раствор) с pH от 3.5 до 10.5. Растворы трилона Б готовили на основе стандартных фиксалялов.

Были использованы следующие биологические препараты: ДНК селезенки крупного рогатого скота фирмы "Reanal" (Венгрия), соотношение N/P - 1,6-1,7, ϵ_p при λ_{max} 280 нм = 6.500-7.500; иммуноглобулин G сыворотки крови норок, инфицированных алеутской болезнью, выделение Ig G проводили методом ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЕ- целлюлозой. Коммерческая сибирязевенная сыворотка крови лошади (Тобольская биофабрика). Коммерческая сыворотка крупного рогатого скота против аденовируса (Курская биофабрика), контрольные сыворотки крови здорового человека, и сыворотки крови больных при отравлении тяжелыми металлами (предоставлены отделением профпатологии 12-й горбольницы, г. Казань). Для приготовления биочувствительной части сенсора была использована нитроцеллюлоза (НЦ) ФТ-30 типа

коллоксилин марки ч. со средним содержанием азота 11.5-12%; органические растворители х.ч. (ацетон, толуол, гексан) и 25 % раствор глутарового альдегида фирмы "Reanal" (Венгрия).

РАЗРАБОТКА СПОСОБА КОВАЛЕНТНОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ДЕНАТУРИРОВАННОЙ ДНК

Большинство описанных в литературе ДНК-содержащих БС основаны на физической, менее эффективной иммобилизации молекул нуклеиновых кислот. Поэтому, одна из задач исследования в этой области- улучшить качество мембран за счет ковалентной иммобилизации ДНК, повысить их однородность, устойчивость во времени и к различным воздействиям в условиях эксперимента. Использование в качестве матричного материала при химической иммобилизации нитроцеллюлозы (НЦ) дает ряд преимуществ: НЦ обладает минимальной неспецифической сорбцией, отличается высокой степенью гидрофильности, наличие большого числа гидрофильных групп позволяет легко ее модифицировать введением различных заместителей. При этом особый интерес представляла иммобилизация однонитевой д-ДНК, поскольку низко- и высокомолекулярные эффекторы ДНК специфичны именно к денатурированной форме, так как при взаимодействии ее с ионами металлов, такими как $Pt(II)$, $Pt(IV)$, $Pb(II)$, $Cd(II)$ и др., они связываются преимущественно с азотистыми основаниями или с фосфатными группами одной цепи ДНК, которые не экранированы водородными связями, при этом межнитевое связывание составляет менее 1%; кроме того, аутоАт также специфичны именно к д-ДНК, в которой антигенные детерминанты не экранированы вторичной структурой. Таким образом, использование д-ДНК позволяет, с одной стороны, обеспечить большую прочность и однородность связывания с НЦ-матрицей при иммобилизации за счет отсутствия межнитевых водородных связей, а с другой стороны, позволяет создать наиболее благоприятные условия для специфичного взаимодействия эффекторов ДНК с поверхностью БС с целью их изучения и определения.

Иммобилизация д-ДНК проводилась на НЦ-мембране с использованием ацетона и толуола в качестве легколетучих растворителей НЦ, что позволяло сократить время контакта биомолекул с органическими растворителями (до 10 мин) и максимально сохранить их биологическую активность; ковалентное связывание д-ДНК с НЦ-мембраной осуществлялось с помощью бифункционального реагента - глутарового альдегида. Для предотвращения неспецифического связывания мембраны с д-ИДНК перед употреблением выдерживались в течение 30 мин в 1 % растворе бычьего сывороточного альбумина.

Из литературы известна способность $Pt(II)$ образовывать с ДНК устойчивый комплекс. Аналитическим сигналом служил максимум тока при $E = -1.2$ В, появляющийся на катодной вольтамперограмме раствора комплекса $Pt(II)$ в присутствии д-ИДНК. Величина максимума зависит от pH и буферной емкости. Наблюдаемый максимум является каталитической волной выделения водорода, обусловленной образованием каталитически активного комплекса ДНК- $Pt(II)$. Величина этого сигнала линейно связана с концентрацией $Pt(II)$ в растворе и может быть использована для контроля за активностью ДНК в НЦ-мембране. Было установлено, что д-ДНК в иммобилизованном состоянии сохраняет свою активность на 78 % по сравнению с д-ДНК в растворе, д-ИДНК не вымывается из НЦ-матрицы и не снижает активность в течение 30 дней. Однородность полученной мембраны контролировалась анализом ее различных участков по высоте катодного пика при $E = -1.2$ В в присутствии комплексов $Pt(II)$. Полученные полупроницаемые мембраны с д-ИДНК площадью 7.95 ± 0.5 см² были использованы в качестве биочувствительной части амперометрического БС на основе стационарного ртутно-пленочного электрода с серебряной подложкой. С помощью полученного БС проводилось 15-18 измерений с учетом реактивации биочувствительной части сенсора. Мембраны, с д-ИДНК, потерявшие активность, заменялись на новые.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДЕНАТУРИРОВАННОЙ ДНК С НИЗКО- МОЛЕКУЛЯРНЫМИ ЭФФЕКТОРАМИ - КОМПЛЕКСАМИ $Pt(II)$ И $Pt(IV)$ И ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ И ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ БИОСЕНСОРА

На основе разработанного БС было изучено взаимодействие комплексов платины с ДНК с целью определения противоопухолевых препаратов в биосредах. Для платины характерно образование устойчивых связей с азотсодержащими лигандами, что приводит к протеканию нуклеофильного замещения ацидолигандов комплексов $Pt(II)$ - цисплатина и $Pt(IV)$ - оксоплатина на азотистое основание ДНК. На вольтамперограммах раствора, содержащего $Pt(II)$ и БС с д-ИДНК наблюдается катодный пик при $E = -1.2$ В; $Pt(IV)$ в присутствии БС с д-ИДНК дает катодный пик при потенциале -0.9 В. Оба пика возрастают прямопропорционально увеличению концентрации комплексов платины. Эти сигналы являются каталитическими волнами выделения водорода, возникающими в результате образования каталитически активных комплексов ДНК- $Pt(II)$ и ДНК- $Pt(IV)$. Комплексообразование платины с ДНК происходит в основном с

образованием внутринитевого хелата с N(7) и O(6) атомами гуанина молекулы ДНК. Так как в нашем случае иммобилизована денатурированная ДНК, комплексообразование с Pt(II) и с Pt(IV) происходит в основном, с N(7) атомами соседних молекул гуанина одной спирали, т.е. имеет место так называемое внутринитевое спивание. Отсутствие водородных связей между азотистыми основаниями, имеющих место в случае нативной ДНК делает возможным и комплексообразование Pt(II) и Pt(IV) с N(3) атомами цитозина, и Pt(II) за счет N(7) и N(1) атомов аденина. Уравнения градуировочных графиков имеют вид:
 Pt(II): $I_n = (2.21 \pm 0.03) c_n + (0.65 \pm 0.02)$ Pt(IV): $I_n = (1.15 \pm 0.04) c_n + (0.32 \pm 0.01)$
 Области определяемых содержаний: для Pt(II) $-[1.0 \times 10^{-6} - 5.0 \times 10^{-10}]$ моль/л, для Pt(IV) $-[1.0 \times 10^{-6} - 5.0 \times 10^{-11}]$ моль/л. Значения c_{\min} , рассчитанные по 3s-критерию, составляет 6×10^{-10} моль/л для оксоплатина и 5×10^{-9} моль/л для цисплатина. Результаты определения приведены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты определения содержания цисплатина и оксоплатина
 в модельных растворах ($n=5, P=0,95$)

Определяемое соединение	Введено, $c \times 10^4$, моль/л	Найдено, $(\bar{c} \pm \delta) \times 10^4$, моль/л	Sr
Цисплатин (Pt(II))	1,50	$1,5 \pm 0,3$	0,16
	5,00	$4,9 \pm 0,6$	0,10
	10,0	$9,9 \pm 0,2$	0,02
	50,0	51 ± 1	0,02
Оксоплатин (Pt(IV))	0,10	$0,09 \pm 0,08$	0,27
	0,50	$0,52 \pm 0,09$	0,14
	1,00	$1,0 \pm 0,1$	0,08
	3,0	$3,0 \pm 0,2$	0,05

БС на основе иммобилизованной ДНК позволяет определять содержание цис- и оксоплатина при их совместном присутствии благодаря достаточной разнице потенциалов описанных выше пиков (табл. 2.), а также делает возможным определение их в биосредах организма без предварительной пробоподготовки.

Таблица 2

Результаты определения оксоплатина в присутствии цисплатина
 ($n=5, P=0.95, t_{\text{расч}}=2.78$)

Введено оксоплатина, мкг/мл	Соотношение оксоплатин : цисплатин в пробе	Найдено оксоплатина $(\bar{c} \pm \delta)$, мкг/мл	s,	t _{расч}
0.005	1:1	0.060 ± 0.015	0.20	1.49
0.012	1:1	0.013 ± 0.002	0.12	1.40
0.012	1:10	0.015 ± 0.003	0.16	2.78
0.012	1:50	0.010 ± 0.002	0.16	2.78

Проведено также определение цисплатина в образцах сыворотки крови. Оценку правильности этой методики проводили способами удвоения массы пробы и введения добавки определяемого компонента. Данные табл. 3 свидетельствуют об отсутствии значимых систематических погрешностей, поскольку выполняются следующие соотношения: $a < t_{0.95; s} \cdot S_a$; $b-1 < t_{0.95; s} \cdot S_b$

Таблица 3

Оценка систематической погрешности при определении цисплатина в сыворотке крови ($n = 8$, $P = 0.95$)

Образцы сыворотки крови	$(\bar{x} \pm \delta)$, мг/л	a	b-1	$t \cdot S_a$ 0.95;	$t \cdot S_b$ 0.95;
1	0.14 ± 0.02	0.050	0.070	0.09	0.08
2	0.28 ± 0.05	0.060	0.100	0.065	0.148
3	0.06 ± 0.01	0.005	0.030	0.013	0.032

Высокая чувствительность молекул ДНК к присутствию экотоксикантов, в частности, к ионам тяжелых металлов, вступающих в комплексобразование с ДНК и нарушающих ее структуру и функции вплоть до денатурации, позволяет использовать БС на основе ДНК как еще одно перспективное средство экологического контроля на примере определения ионов тяжелых металлов ($Pb(II)$ и $Cd(II)$). На основании изучения зависимости высоты тока пика восстановления ионов $Pb(II)$ и $Cd(II)$ от времени накопления при различных концентрациях исходных растворов ионов металлов установлено минимальное время накопления этих ионов на биочувствительной части сенсора - 15 мин (рис. 1).

I, мкА

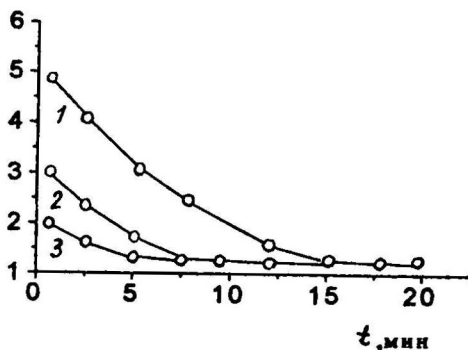


Рис. 1 Зависимость величины тока пика при $E = -0.65$ В от времени накопления $Cd(II)$ на д-ИДНК; $C_{Cd(II)}$: 1- 0.5×10^{-5} моль/л; 2- 1.0×10^{-6} моль/л; 3- 1.0×10^{-7} моль/л; аммиачный буферный раствор pH 7.3, БС.

Определена сорбционная емкость д-ИДНК содержащей поверхности предлагаемого БС в присутствии ионов тяжелых металлов. Изотермы сорбции этих ионов на д-ИДНК построены на основании уравнений Лэнгмюра (рис. 2). Максимальная сорбирующая способность биочувствительной части сенсора составляет 4.8×10^{-6} моль ($Pb(II)$) и 3.3×10^{-6} моль ($Cd(II)$), что свидетельствует о большем сродстве ионов $Pb(II)$ к д-ДНК, чем ионов $Cd(II)$. Рассчитанные по методу Скэтчарда константы связы-

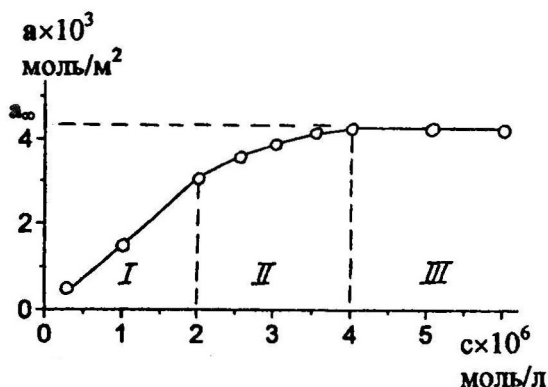


Рис. 2 Изотермы сорбции Ленгмюра ионов Cd(II) на д-ИДНК; области: I – прямолинейной зависимости, II – искажения прямолинейной зависимости, III – выхода зависимости на предел a_{∞} .

Для многократного использования БС были разработаны условия реактивации биочувствительной части с д-ИДНК с помощью комплексона III. На основании зависимости величины тока восстановления комплексонатов Cd(II) и Pb(II) при потенциалах -0.9 и -0.7 В соответственно от времени реактивации при различных концентрациях иона металла было выбрано оптимальное время реактивации – 20 мин (рис. 3). Устойчивость комплексоната металла и концентрирование ионов тяжелых металлов в приэлектродном слое на биочувствительной части сенсора за счет комплексообразования с ДНК позволяет определять концентрации ионов Cd(II) до 1×10^{-9} моль/л, и Pb(II) до 3×10^{-10} моль/л. Достаточная разница в потенциалах восстановления комплексонатов Cd(II) и Pb(II) позволяет определять ионы свинца и кадмия в модельных растворах при их совместном присутствии (табл. 4) с фактором селективности 1:10.

Таблица 4

Результаты определения Pb(II) и Cd(II) в модельных растворах при совместном присутствии ($n=5$, $P=0.95$)

Введено $\text{с} \times 10^3$, моль/л		Найдено $(\bar{c} \pm \delta) \times 10^3$, моль/л		Sr	
Pb(II)	Cd(II)	Pb(II)	Cd(II)	Pb(II)	Cd(II)
0.25	0.25	0.26 ± 0.03	0.23 ± 0.08	0.28	0.28
1.0	1.0	2.0 ± 0.3	1.0 ± 0.4	0.23	0.32
5.0	5.0	5.1 ± 0.05	5.2 ± 0.9	0.13	0.14
1.0	2.0	0.97 ± 0.06	2.1 ± 0.3	0.04	0.11
1.0	10.0	0.98 ± 0.06	9.8 ± 0.4	0.05	0.03

вания ионов металлов с д-ДНК равны $(1.2 \pm 0.3) \times 10^6$ л/моль и $(0.6 \pm 0.2) \times 10^5$ л/моль для Pb(II) и Cd(II) соответственно. Эти данные свидетельствуют о прочном связывании ионов тяжелых металлов с д-ДНК, что приводит к их мутагенному действию и указывает на необходимость определения содержания тяжелых металлов в различных объектах именно с помощью ДНК-содержащего БС.

На основании разработанной методики было проведено определение содержания тяжелых металлов в реальных экологических объектах, предоставленных СЭС г. Казани - молоке и питьевой воде до и после использования бытового фильтра.

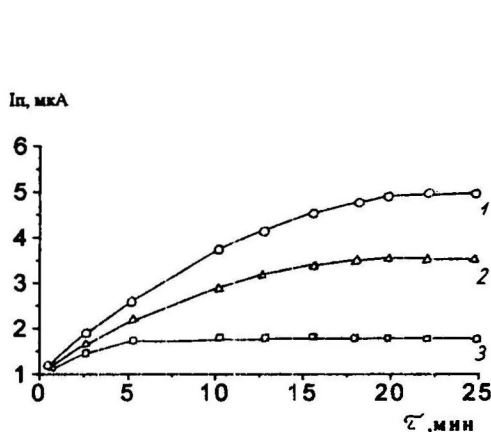


Рис. 3 Зависимость величины тока пика при $E = -0.9$ В от времени реактивации БС при различных концентрациях ионов $Cd(II)$: 1- 1×10^{-5} моль/л, 2- 0.5×10^{-6} моль/л, 3- 1×10^{-7} моль/л, аммиачный буферный раствор pH 7.3.

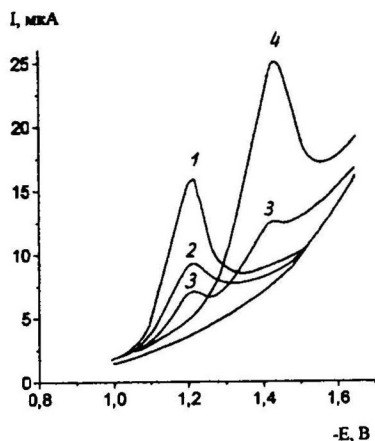


Рис. 4 Вольтамперограммы растворов $Pt(II)$: 1- в отсутствие At к ДНК; 2- в присутствии 0.7×10^{-9} моль/л At к ДНК; 3- 1.3×10^{-9} моль/л At к ДНК; 4- 0.7×10^{-8} моль/л At к ДНК. фосфатно-солевой буфер, pH 6.7, $C_{Pt(II)} = 1 \times 10^{-5}$ моль/л, БС на основе д-ИДНК.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДЕНАТУРИРОВАННОЙ ДНК С ВЫСОКО-МОЛЕКУЛЯРНЫМИ ЭФФЕКТОРАМИ- АУТОАНТИТЕЛАМИ И ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ БИОСЕНСОРА

Показана также возможность использования разработанного БС для контроля протекания иммунологических реакций с участием ДНК и диагностики заболеваний. Была изучена реакция иммунологического связывания ДНК с высокомолекулярными эффекторами - аутоАт. Они образуют иммунологический комплекс ДНК-Ат за счет комплементарности пептидных функциональных групп антитела фосфатно-сахаридному скелету молекулы ДНК. При введении аутоАт в раствор, содержащий БС с д-ИДНК и $Pt(II)$, величина катодного максимума при $E = -1.2$ В уменьшается по мере повышения концентрации Ат вследствие экранирования части каталитически активных комплексов ДНК- $Pt(II)$ в результате биоспецифического взаимодействия ДНК с аутоАт

(рис. 4, кривая 2). При добавлении к раствору избытка $Pt(II)$ появляется второй максимум токи при -1.4 В, увеличивающийся с ростом концентрации At (см. рис. 4, кривая 3). Величина первого аналитического сигнала при $E = -1.2$ В использована для разработки методики определения ауто At в диапазоне концентраций $5.0 \times 10^{-10} - 1.3 \times 10^{-9}$ моль/л, схема иммуноанализа приведена на рис. 5(а).

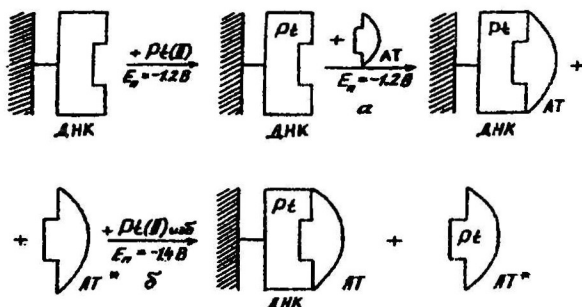


Рис. 5 Схема иммуноанализа с помощью БС на д-ИДНК: а - при $c_{At} = 5 \times 10^{-10} - 1.3 \times 10^{-9}$ моль/л; б - при $c_{At} = 1.3 \times 10^{-9} - 7.0 \times 10^{-8}$ моль/л; * - несвязанные At в растворе при $c_{At} > 1.3 \times 10^{-9}$ моль/л.

При содержании At в исследуемом растворе, превышающем 1.3×10^{-9} моль/л сигнал при $E = -1.2$ В исчезает из-за полного насыщения мест связывания ДНК антителами. Для расширения области определяемых концентраций ауто At и возможности использования БС для определения более высоких содержаний иммуноглобулинов в сыворотке крови проведено изучение второго катодного максимума при $E = -1.4$ В, появляющегося при концентрациях At выше 1.3×10^{-9} моль/л. Этот катодный сигнал также обязан каталитическому выделению водорода, возникающему при комплексообразовании $Pt(II)$ с At . Полная схема иммуноанализа приведена на рис. 5. Результаты определения ауто At в широком диапазоне концентраций от 7.0×10^{-8} до 5.0×10^{-10} моль/л представлены в табл. 5. На основании графика Скэтчарда определены константы связывания биоспецифического взаимодействия ДНК- At : $K_{1 \text{ смз}} = 1.25 \times 10^9$ л/моль, $K_{2 \text{ смз}} = 2.5 \times 10^8$ л/моль. Полученные значения констант свидетельствуют о прочном, а следовательно специфичном взаимодействии компонентов иммунохимической реакции ДНК-ауто At . Проведены определение ауто At в сыворотке крови животных и диагностика алеутской болезни норки (АБН) по 3s-критерию с помощью БС, результаты диагностики контролировались иммуноферментным анализом (ИФА) со спектрофотометрической индикацией сигнала (табл. 6). Из данных табл. 6

Таблица 5

Результаты определения специфических аутоантител в модельных растворах
($n=5$, $P=0.95$)

Введено, $\text{с} \cdot 10^9$ моль/л	Найдено, $(\bar{c} \pm \delta) \cdot 10^9$ моль/л	S,
0.50	0.52 ± 0.05	0.07
0.75	0.73 ± 0.04	0.05
1.00	0.98 ± 0.05	0.04
3.0	3.0 ± 0.1	0.03
5.5	5.6 ± 0.1	0.02
10.0	9.9 ± 0.2	0.02
20.0	22 ± 0.6	0.02

следует, что результаты диагностики с помощью разработанного иммуноанализа с использованием БС хорошо согласуются с результатами контрольного метода.

Таблица 6

Определение ауто-АТ и диагностика АБН с помощью биохимического сенсора на основе д-ИДНК и методом ИФА.

(БС: $I_p^0 = 15$ мкА, $3s=1,5$ мкА; ИФА: $A^0=0,035^*$, $3s=0,105$)

I_p , мкА	C_{AT} , моль/л	А при $\lambda=492$ нм	Результаты диагностики**	
			БС	ИФА
5,0	$5,0 \cdot 10^{-4}$	0,507	+	+
8,0	$5,0 \cdot 10^{-9}$	0,311	+	+
15,0	$2,0 \cdot 10^{-10}$	0,012	—	—

* A^0 - величина поглощения раствора сыворотки неинфицированных животных

** + - животное инфицировано; — - животное не инфицировано

Таким образом, разработан способ ковалентной иммобилизации денатурированной ДНК на нитроцеллюлозной мембране, амперометрический БС на основе д-ИДНК использован для изучения и количественной оценки взаимодействия ДНК с различными низко- и высокомолекулярными эффекторами и для их чувствительного специфичного определения в биологических и экологических объектах.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ ковалентной иммобилизации д-ДНК на нитроцеллюлозной мембране. Нитроцеллюлозные мембраны с д-ИДНК однородны, д-ИДНК, сохраняет свою реакционную способность по сравнению с неиммобилизованной на 78%. Предложен амперометрический БС, состоящий из транс-дьюсера - стационарного ртутно-плёночного электрода с серебряной подлож-

кой и биочувствительной части на основе д-ИДНК. Биочувствительная часть сенсора сохраняет стабильность, реакционную способность, и воспроизводимость в работе в течение не менее 30 дней. Подобраны оптимальные условия функционирования разработанного амперометрического БС. Найдены способы реактивации биочувствительной части сенсора исходя из природы анализируемых эффекторов с целью многократного ее использования.

2. Оценена сорбционная емкость д-ИДНК-содержащей поверхности предлагаемого БС в присутствии ионов тяжелых металлов. Выявлены различия в сорбируемости ионов $Pb(II)$ и $Cd(II)$ на биочувствительной поверхности сенсора. Изотермы сорбции этих ионов на д-ИДНК из фосфатно-солевого буферного раствора с pH 6.7-7.3 описываются уравнениями Ленгмюра. Максимальная сорбирующая способность биочувствительной части сенсора составляет 3.3×10^{-6} моль ($Cd(II)$) и 4.8×10^{-6} моль ($Pb(II)$), что свидетельствует о большем сродстве ионов $Pb(II)$ к д-ДНК, чем ионов $Cd(II)$. В соответствии с этим рассчитанные по методу Скэтчарда константы связывания ионов металлов с д-ДНК равны $(1.2 \pm 0.3) \times 10^6$ л/моль и $(0.6 \pm 0.2) \times 10^5$ л/моль для $Pb(II)$ и $Cd(II)$ соответственно.

3. Установлены оптимальные условия определения $Pb(II)$ и $Cd(II)$ в модельных растворах в результате предварительного концентрирования на биочувствительной части сенсора в виде комплексов $Pb(II)$ и $Cd(II)$ с д-ИДНК с последующим десорбированием в виде их комплексонов, токи восстановления которых позволяют определять кадмий и свинец с пределом обнаружения 1×10^{-9} моль/л и 3×10^{-10} моль/л соответственно.

4. Обнаружена каталитическая активность по отношению к выделению водорода на электроде $Pt(II)$ и $Pt(IV)$ в присутствии д-ИДНК в составе БС. Доказана природа аналитического сигнала, определены факторы, влияющие на его величину, показана возможность его использования для селективного определения содержания $Pt(II)$ и $Pt(IV)$ в анализируемых растворах. Выбраны условия определения противоопухолевых препаратов на основе $Pt(II)$ и $Pt(IV)$ цисплатина и оксоплатина. Пределы обнаружения фармпрепаратов составляют 6×10^{-10} моль/л (оксоплатин) и 5×10^{-9} моль/л (цисплатин) в присутствии марганца, железа, меди и цинка.

5. Амперометрический БС на основе д-ИДНК использован для контроля прохождения иммунохимической реакции д-ДНК с аутоАт. Использование БС

в иммунохимии основано с одной стороны, на аналитическом сигнале, обусловленном выделением каталитических токов выделения водорода в результате образования каталитически активного комплекса $Pt(II)$ -д-ДНК, а с другой стороны, на уменьшении данного аналитического сигнала, происходящем вследствие экранирования части каталитически активных комплексов ДНК- $Pt(II)$. Экранирование наблюдается при введении в эту систему Ат, специфичных к ДНК, которые образуют иммунокомплексы ДНК- $Pt(II)$ -аутоАт. Определены константы связывания при взаимодействии аутоАт с д-ИДНК. Показано, что комплексы ДНК-аутоАт обладают достаточной прочностью, константы связывания для двух видов аутоАт составляют 1.25×10^9 л/моль и 2.5×10^8 л/моль. Показана возможность селективного, быстрого, высокочувствительного определения компонентов биоспецифического взаимодействия.

6. На основе предложенного амперометрического д-ИДНК-содержащего БС разработаны методики определения низко- и высокомолекулярных эффекторов ДНК в биологических объектах и объектах окружающей среды. На основании предложенных методик было проведено определение содержания ионов $Pb(II)$ и $Cd(II)$ в сыворотках крови, молоке, а также в образцах воды до и после очистки с помощью производственного фильтра, онкопрепарата цисплатина в сыворотке крови, содержания аутоАт в сыворотке крови животных, пораженных алеутской болезнью. Сравнением результатов, полученных при проведении анализа по предложенным методикам с участием д-ИДНК-содержащего БС, с результатами контрольных методов, а также методом удвоения массы пробы и введения добавки определяемого компонента оценена правильность аналитических методик.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Бабкина С.С., Улахович Н.А., Медянцева Э.П., Зявкина Ю.И. Амперометрический биосенсор на основе дезоксирибонуклеиновой кислоты и комплексов платины(II): новые аналитические возможности// Журн. аналит. химии.-1999.-Т 54, № 11.- С.1205-1211.
2. Улахович Н.А., Бабкина С.С., Зявкина Ю.И. Определение эффекторов дезоксирибонуклеиновой кислоты с помощью биохимического амперометрического сенсора// Российский химический журнал. Журн. РХО им Д.И. Менделеева.-1999.-Т 43, № 3-4.- С.147-149.

3. Babkina S.S., Ulakhovich N.A., Medyantseva E.P., Zyavkina Yu.I. Amperometric biochemical sensor based on immobilized deoxyribonucleic acid (DNA): a new tool for ecological monitoring// Ecological congress.-2000.-V. 3, № 2.- P. 37-42.

4. Бабкина С.С., Улахович Н.А., Зявкина Ю.И. Амперометрический биосенсор на основе иммобилизованной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для экологического и биохимического анализа// Тез. докл. XVI Менделеевского съезда по общей и прикл. химии.-М., 1998.- С. 19.

5. Babkina S.S., Ulakhovich N.A., Medyantseva E.P., Zyavkina Yu.I. New amperometric biosensors based on DNA for anti-DNA antibodies immunoassay// Abstr. 7th European Conference on Electroanalysis (ESEAC'98) -Portugal, Coimbra.- 1998.- P. 194.

6. Бабкина С.С., Зявкина Ю.И., Нугасва З.Т. Вольтамперометрическое определение Pt(IV) и Pt(II) в биообъектах с помощью биосенсора на основе иммобилизованной дезоксирибонуклеиновой кислоты// Тез. докл. Поволжской региональной конференции: Физико-химические методы в координационной и аналитической химии. Казань, 1999.- С. 88.

7. Бабкина С.С., Улахович Н.А., Зявкина Ю.И. Вольтамперометрическое определение биологически активных веществ на основе их комплексообразования с иммобилизованной ДНК// Тез. докл. Всеросс. конф. по электрохимич. методам анализа.- ЭМА-99.- Москва.- 1999.- С. 7.

8. Babkina S.S., Ulakhovich N.A., Zyavkina Yu.I. Voltammetric sensor based on mercury film-covered silver electrode and immobilized DNA and its use in DNA effectors assay// Abstr. of conf. "Modern Electroanalytical Methods "Czech. Republic, Pardubice. 1999.-PO/45.

9. Улахович Н.А., Бабкина С.С., Зявкина Ю.И., Моисеева Е.Н. Влияние тяжелых металлов на дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и оценка их экотоксичности с помощью биосенсора на основе ДНК// Тез. докл. IV Всерос. конф. "Экоаналитика 2000", Краснодар, 2000.- С. 140-141.

10. Бабкина С.С., Улахович Н.А., Зявкина Ю.И. Определение платины в фармпрепаратах и биообъектах с помощью амперометрического биосенсора на основе дезоксирибонуклеиновой кислоты// Завод. лаборатория.- 2000.- Т. 66, № 12. (в печати).



Издательство «Экоцентр»
Без объявл. – 2000
Лицензия № 0307 от 8.06.2000

Отпечатано с готового оригинал-макета. Печать RISO.

Бумага офсет № 1. Формат 60*84 1/16.

Объем 1,25 п.л. Тираж 100 экз. Заказ 15.

Отпечатано на полиграфическом участке издательства «Экоцентр»,
г. Казань, ул. К. Маркса, 70.

